

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 2

Sur le dosage de la Cystéine
dans les Protéines

THESE

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille*

par

Henri VERDEIL

Pharmacien

pour obtenir le grade

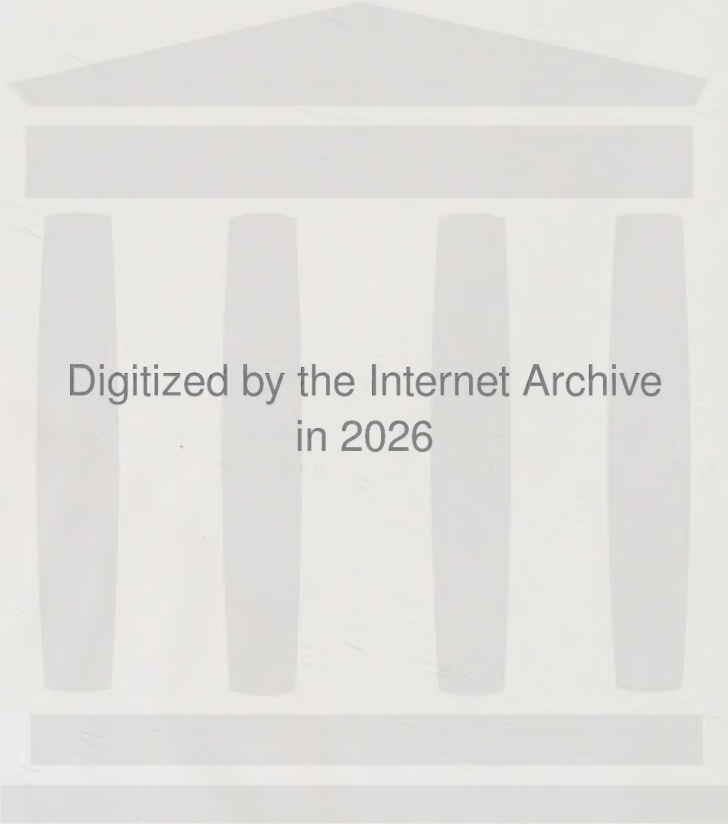
de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ en PHARMACIE

Examinateurs
de la Thèse

MM. Professeur C. DUMAZERT, Président
Professeur J. DELPHAUT
Agréé M. MOURGUE
Agréé C. GREBUS

assesseurs

1954



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N°

Sur le dosage de la Cystéine
dans les Protéines

THESE

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille*

par

Henri VERDEIL

Pharmacien

pour obtenir le grade

de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ en PHARMACIE

Examineteurs
de la Thèse

MM. Professeur C. DUMAZERT, Président
Professeur J. DELPHAUT
Agréé M. MOURGUE
Agréé C. GREBUS

assesseurs



A la mémoire de mon Père,

A tous mes Parents et à mes Amis,

A Monsieur le professeur DUMAZERT,

*avec mes sincères remerciements et en
gage de notre vieille et fidèle amitié.*

A Messieurs les Professeurs, membres de mon Jury de thèse,

*En respectueux hommage de bien vive
gratitude.*

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : G. MORIN

Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen Honoraire : L. IMBERT

Professeurs Honoraires : MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI
PREMOND, GAUJOUX, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER
RIMATTEI, ROCHE, ROGER.

Chargé de Cours Honoraires : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} PERRIN

Professeurs

<i>Anatomie</i>	GRISOLI
<i>Anatomie Pathologique et Carcinologie clinique</i>	GASTAUD
<i>Bactériologie et Pathologie Générale</i>	BRAHIC
<i>Chimie Analytique et Hydrologie</i>	ARNOUX
<i>Chimie Médicale</i>	DERRIEN
<i>Chimie</i>	DUMAZERT
<i>Clinique Chirurgicale</i>	FIOLE
<i>Clinique Chirurgicale</i>	MOIROUD
<i>Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique</i>	SALMON
<i>Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale</i>	DE VERNEJOUL
<i>Clinique Dermato-syphiligraphique</i>	CHARPY
<i>Clinique Exotique</i>	BLANC
<i>Clinique des Maladies du Système Nerveux</i>	POURSINES
<i>Clinique Médicale</i>	MATTEI
<i>Clinique Médicale</i>	POINSO
<i>Clinique Médicale Thérapeutique</i>	OLMER
<i>Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition</i>	MONGES
<i>Clinique Médicale Infantile</i>	GIRAUD
<i>Clinique Neuro-Chirurgicale</i>	PAILLAS
<i>Clinique Obstétricale et Gynécologie</i>	CHOSSON
<i>Clinique Ophtalmologie</i>	JAYLE
<i>Clinique Urologique</i>	CHAUVIN
<i>Histoire Naturelle</i>	PELLISSIER
<i>Histologie</i>	ROMIEU
<i>Hygiène et Médecine Préventive</i>	VIOLLE
<i>Matière Médicale</i>	BALANSARD
<i>Hygiène Légale et Médecine du Travail</i>	MOSINGER
<i>Parasitologie</i>	SAUTET
<i>Pathologie Chirurgicale</i>	CARCASSONNE
<i>Pharmacologie</i>	F. MERCIER
<i>Pharmacologie Chimique et Toxicologie</i>	VIGNOLI
<i>Pharmacie Galénique</i>	DELPHAUT
<i>Physiologie</i>	MORIN
<i>Physique Médicale</i>	DUBOULOZ
<i>Thérapeutique</i>	PIERI

Maîtres de Conférences Agrégés

MM. BOURRET
DONNET
GREBUS
J. MERCIER

MM. MOURGUE
PICARD
RANQUE
ROUX

Agrégés en exercice

MM. APPAIX
BERNARD
CREMIEUX
GRANJON
HENRY
JOUVE
LAMY
LAVAL
LENA

MM. MARONNEAUD
MONGES Henri
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT
VAGUE

Agrégés libres

MM. AUDIER
BERTHIER
BRAHIC

MM. DOR
FIGARELLA
IMBERT
RECORDIER

Chargé des fonctions d'Agrégé

Anatomie Pathologique PAYAN

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N.

Sur le dosage de la Cystéine
dans les Protéines

THESE

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille*

par

Henri VERDEIL

Pharmacien

pour obtenir le grade

de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ en PHARMACIE

Examineurs
de la Thèse

MM. Professeur C. DUMAZERT, Président

Professeur J. DELPHAUT

Agrégé M. MOURGUE

Agrégé C. GREBUS

} assesseurs

INTRODUCTION

Le dosage des acides aminés implique l'hydrolyse de la protéine ; c'est pourquoi il est indispensable de préciser les conditions de cette opération lorsqu'on se propose de doser la cystéine. Ces deux acides aminés sont rapidement détruits sous l'action des alcalis, aussi ne pourra-t-on faire appel qu'à l'action des acides et éventuellement à celle des enzymes protéolytiques.

L'emploi des acides peut également entraîner des pertes en acides aminés sulfurés. Aussi les conditions de l'hydrolyse acide doivent-elles être précisées. BOLLING et BLOCK (12) n'ont pas observé de pertes en cystine à la suite du chauffage pendant 20 heures de la β -lactoglobuline, en présence d'un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique à 18 p. 100 et d'acide formique à 90 p. 100. LUGG (24) préconise l'emploi de l'acide chlorhydrique seul lorsque le milieu ne contient pas d'hydrates de carbone, mais il insiste sur le fait que la destruction de la cystine et surtout de la cystéine devient de plus en plus importante au fur et à mesure que la proportion de ces derniers augmente.

L'acide sulfurique paraît toujours conduire à de notables pertes en acides aminés sulfurés. L'acide iodhydrique qui réalise un milieu fortement réducteur a été utilisé par LUGG (25) avec succès. Cependant l'emploi de cet acide réalise la déméthylation de la méthionine en homocystéine et de ce fait ne peut être choisi dans les cas où le dosage se termine selon une méthode mettant en œuvre la labilité du soufre engagé sous forme de groupement $-SH-$; HESS, SULLIVAN et PALMES (21) évitent toute destruction au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à 20 p. 100 en opérant en présence de 1 p. 100 de chlorure de titane ($TiCl_3$), réducteur puissant.

En résumé, on doit adopter comme règle générale de poursuivre l'hydrolyse en milieu réducteur et si possible éliminer, le cas échéant, l'excès d'hydrates de carbone. L'emploi de l'acide chlorhydrique associé à celui de l'acide formique paraît la solution la plus simple et la plus sûre pour effectuer l'hydrolyse des protéines en vue du dosage de la cystine et de la cystéine.

Les méthodes de détermination de la cystine et de la cystéine sont nombreuses. Nous les classerons d'après le principe qu'elles mettent en œuvre. Nous envisagerons donc successivement les méthodes fondées sur les principes suivants :

- 1° — détermination de la cystine d'après la labilité du soufre dans cette molécule,
- 2° — réduction de l'acide phospho-tungstique,
- 3° — détermination de la cystine par iodométrie,
- 4° — coloration rouge donnée par la cystéine avec le 1-2 naphtho-quinone 4 sulfonate de sodium (réaction de SULLIVAN),

- 5° — précipitation de la cystéine sous forme de mercaptide cuivreux,
- 6° — condensation avec la diméthyl-p. phénylène-diamine (FLÉMING),
- 7° — réaction colorée avec le nitroprussiate de sodium,
- 8° — méthodes diverses.

1° DÉTERMINATION DE LA CYSTINE

D'APRÈS LA LABILITE DU SOUFRE

MULDER, en 1838, a le premier mis en évidence la formation de sulfure métallique lorsqu'on chauffe les protéines avec un sel de métal lourd et en milieu alcalin. On utilise couramment le chauffage de la cystine et de la cystéine en présence d'acétate de plomb et de soude pour caractériser ces amino-acides par l'apparition d'un précipité noir de sulfure de plomb.

Les premières applications de ce type de réaction sont dues à ZAHND et BLUMENTHAL (11). La cystine est réduite en cystéine par le zinc en milieu acide. A chaud, la cystéine cède tout son soufre sous forme de sulfure de plomb. Le mode opératoire est le suivant :

— à 5 cm³ d'hydrolysât protéique contenant 0,5 à 1 mg. de cystine, ajouter 4 à 5 fois la quantité théorique de zinc en poudre et 1 cm³ d'acide chlorhydrique N. chauffer au B.M. jusqu'à dissolution du zinc. Ajouter 0,2 cm³ d'une solution d'acétate de plomb à 10 p. 100 et 2 cm³ de soude à 20 p. 100. Sceller le tube et chauffer à 95°C pendant 24 heures au moins. Isoler le sulfure de plomb et le laver par centrifugation avec de la soude à 1 p. 100 puis l'oxyder en sulfate par addition de 0,5 gr. de chlorate de potassium et de 4 à 5 cm³ du réactif suivant : brôme 10 cm³, acide chlorhydrique concentré 150 cm³ et eau distillée 100 cm³. Agiter jusqu'à disparition de la coloration noire du sulfure de plomb. Chasser le chlore en chauffant au B.M. après avoir ajouté 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. Evaporer à sec. Extraire le résidu à deux reprises avec de l'acide chlorhydrique à 20 p. 100 et en filtrant pour éliminer la silice. Evaporer le filtrat à sec. Redissoudre dans l'acide chlorhydrique 0.1 N et dans cette solution doser l'ion sulfate par précipitation au moyen du chlorure de baryum selon la technique classique.

Plus tard, THOMAS et HENDRICKS (43) fixent le soufre de la cystine par chauffage en présence de magnésie et de chlorure de cadmium. L'hydrogène sulfuré du sulfure de cadmium est alors déplacé par aération en milieu acide et fixé à nouveau sous forme de sulfure de zinc par barbotage dans une solution d'acétate de zinc. L'ion sulfhydrique est finalement dosé par iodométrie ou par transformation en bleu de méthylène grâce à la diméthyl-p-phénylène diamine.

2° RÉDUCTION DE L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE

WINTERSTEIN (1901) signale que la cystéine précipite d'abord en présence d'acide phosphotungstique, puis qu'elle réduit lentement ce dernier pour donner une intense coloration bleue. La cystine ne donne cette réaction qu'après avoir été réduite en cystéine. Le réducteur employé est le plus souvent le cyanure de potassium.

La méthode de FOLIN et LOONEY (15) est une des premières en date. Elle met en œuvre un réactif phospho-18-tungstique préparé comme suit : on fait bouillir pendant plusieurs heures le mélange de 100 gr. de tungstate de sodium, 80 cm³ d'acide phosphorique à 85 p. 100 et 750 cm³ d'eau distillée. Après refroidissement on filtre et porte à un litre.

On hydrolyse sous réfrigérant à reflux, 1 à 5 gr. de protéine en présence de 25 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 en chauffant pendant 12 heures. Diluer l'hydrolysât à 100 cm³. On prélève selon les cas 1 à 10 cm³ de cette liqueur dans un ballon jaugé de 100 cm³ ; on ajoute 20 cm³ de solution saturée de carbonate de sodium et 10 cm³ d'une solution de sulfite de sodium à 20 p. 100 (pour réduire la cystine en cystéine). Au bout de 5 minutes on ajoute en agitant 3 cm³ du réactif phosphotungstique. Après 10 minutes on complète à 100 cm³ avec de l'eau distillée ; cette liqueur fortement teintée en bleue est soumise à la mesure colorimétrique et on se rapporte à un étalon préparé avec une solution de cystine traitée d'une façon identique.

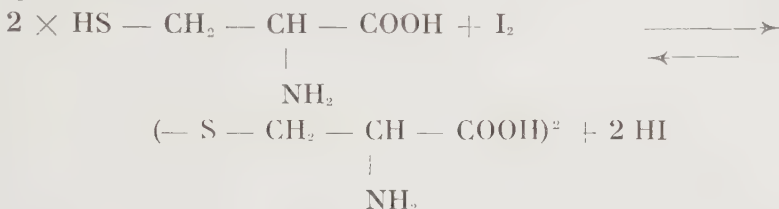
Le défaut de cette technique est son manque de spécificité ; en effet, l'hydrolysât peut contenir des substances réductrices susceptibles de donner elles aussi une coloration bleue avec le réactif phosphotungstique. La présence fréquente de molybdène dans le tungstate de soude est aussi une cause d'erreur car l'acide phosphomolybdique est réduit avec virage au bleu par la tyrosine et autres substances phénoliques ainsi que par certains produits de dégradation des hydrates de carbone. Aussi cette méthode a-t-elle été l'objet de perfectionnements divers. Tout d'abord FOLIN et MARENZI (16) précisent les conditions de préparation d'un réactif phospho-tungstique dépourvu de toutes traces de molybdène. TOMPSETT (47) remplace le carbonate de soude par le bicarbonate en solution saturée ce qui évite d'obtenir des solutions troubles pour la colorimétrie.

BLOCK et BOLLING (10) adoptent finalement le mode opératoire suivant : l'hydrolyse porte sur 50 à 250 mg. de protéine chauffée à reflux pendant 18 heures en présence de 5 cm³ d'un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique à 18 p. 100 et d'acide formique à 90 p. 100. On évapore l'hydrolysât jusqu'à consistance sirupeuse au B.M. La cystéine passe intégralement sous la forme de cystine. On dilue et porte à volume connu (décolorer au charbon si nécessaire). Deux fractions aliquotes de même volume (correspondant de 0,4 à 1,2 mg. de cystine) sont introduites respectivement dans deux éprouvettes graduées de 50 cm³. On complète à 5 cm³ par de l'eau distillée. On ajoute dans chaque essai 5 cm³ d'une solution saturée de bicarbonate de sodium puis 2 cm³ de réactif phosphotungstique dilué au préalable avec son volume d'eau distillée. Dans l'un des essais qui servira de témoin on ajoute 1 cm³ d'eau distillée tandis que l'autre éprouvette est additionnée de 1 cm³ d'une solution fraîchement préparée de sulfite neutre de sodium à 10 p. 100. Après mélange on abandonne pendant huit minutes à la température du laboratoire, puis on dilue à des volumes égaux par de l'eau distillée. On procède alors à la lecture photométrique (Filtre = 520 m μ).

L'avantage de la méthode est de permettre de déduire de l'absorption lumineuse de l'essai celle relative au témoin et qui peut être due à des substances autres que la cystine et capables de réagir avec le réactif phosphotungstique.

3° MÉTHODES IODOMÉTRIQUES

Dès 1901, MORNER signale que la cystéine peut être dosée directement par iodométrie en milieu acide :



Sur ce principe général OKUDA (30) établit une technique répondant au mode opératoire suivant :

— L'hydrolyse porte sur 1 à 2 mg. de protéine et la cystine est au préalable réduite en cystéine par action du zinc en milieu chlorhydrique. La solution est finalement portée à 100 cm³ dont on prélève 20 cm³. On doit ajuster cette prise d'essai de telle sorte qu'elle contienne 2 p. 100 d'acide chlorhydrique libre. On y ajoute alors 5 cm³ d'une solution à 5 p. 100 d'iodure de potassium et 5 cm³ d'acide chlorhydrique à 4 p. 100. Enfin, on titre avec une solution M/300 d'iodate de potassium jusqu'à coloration jaune persistante. Pour le calcul des résultats on compare avec une solution standard de cystéine traitée d'une façon identique. En effet, ceux-ci ne correspondent pas à l'équation théorique ci-dessus. L'addition d'empois d'amidon permet de mieux saisir la fin de la réaction par l'obtention d'une coloration bleue montrant la présence d'un excès d'iode lorsque la cystéine ne le fixe plus au fur et à mesure de sa libération à partir de la réaction des acides iodhydrique et iodique :



VIRTUE 15 LEWIS (52), puis LAVINE (23) apportent à ce procédé des modifications mineures. Dans l'ensemble les résultats obtenus ne s'accordent pas avec la réaction théorique parce que, à notre sens, la réaction est réversible. Cela permet de prévoir que l'on pourrait tout aussi bien baser le dosage sur la réduction de la cystine en cystéine sous l'action de l'acide iodhydrique ; l'iode libérée serait alors titrée par l'hyposulfite. Toute la difficulté réside en fait dans la détermination dans un sens ou dans l'autre d'une façon complète. Mais en outre il faut signaler qu'un hydrolysats protéique contient toujours d'autres substances que les acides aminés sulfurés susceptibles de réagir selon le cas avec l'iode ou l'acide iodhydrique.

4° REACTION DE SULLIVAN

En 1926, SULLIVAN montre que, seul de tous les acides aminés, la cystéine donne une coloration rouge avec le 1 - 2 naphthoquinone - 4 - sulfonate de sodium, en milieu alcalin et en présence d'hyposulfite de sodium.

FOLLIN (14) décrit minutieusement la préparation du 1 - 2 naphthoquinone - 4 - sulfonate de sodium que l'on ne trouve pas dans le commerce. La cystine présente dans l'hydrolysât est réduite en cystéine par le cyanure de sodium : pour une prise d'essai (5 cm³) contenant environ 0,4 mg. de cystine on utilise 1 cm³ d'une solution de cyanure de sodium à 5 p. 100 que l'on fait agir pendant 10 minutes à la température du laboratoire. On ajoute alors 1 cm³ de la solution de 1 - 2 naphthoquinone - 4 - sulfonate de sodium à 0,5 p. 100. Agiter et ajouter 5 cm³ d'une solution d'hyposulfite à 10 p. 100 dans la soude 0,5 N et enfin 1 cm³ de la solution de cyanure de sodium à 5 p. 100. Attendre 20 minutes. L'addition de 1 à 2 cm³ d'une solution d'hyposulfite de sodium à 2 p. 100 dans la soude 0,5 N permet d'éliminer certaines colorations parasites. Procéder à la comparaison colorimétrique avec des solutions de cystine traitées d'une façon identique.

La spécificité de la réaction de SULLIVAN rend cette méthode particulièrement séduisante. Cependant, pour des raisons mal connues, elle conduit à des résultats parfois décevants et, de ce fait, elle a fait l'objet de nombreuses modifications (42). En particulier ROSSOUY et WILKEN-JORDEN (32) préconisent une précipitation préalable de la cystine par le chlorure cuivreux. Ils sont suivis dans cette voie par ZITTLE et O'DELL et par CSONKA.

5° PRÉCIPITATION DE LA CYSTÉINE

SOUS FORME DE MERCAPTIDE CUIVREUX

En 1929, HOPKINS montre que les thiols tels que le glutathion réduit sont quantitativement précipités par l'oxyde cuivreux en milieu faiblement acide. Tel est le principe des techniques suivantes dont la première est due à VICKERY et WHITE (51) :

— l'oxyde cuivreux est préparé au moment du besoin par réduction à chaud d'une quantité suffisante de liqueur de Fehling au moyen d'une solution de glucose. Le précipité obtenu est lavé par décantation. L'hydrolyse porte sur 2 gr. de protéine que l'on chauffe pendant 24 heures dans 20 cm³ d'acide sulfurique 8 N en présence de 2 à 3 gr. d'étain. L'hydrolysate est alors filtré et dilué à 100 cm³. On chauffe cette solution aux environs de 45°C et on y ajoute en agitant la suspension aqueuse d'oxyde cuivreux par fraction d'environ 200 mg. jusqu'à ce qu'il y ait un excès (ce dont on s'aperçoit par le changement de couleur du précipité qui passe du gris au rouge). En refroidissant énergiquement on ajoute alors, goutte à goutte, de la lessive de soude à 40 p. 100 jusqu'à pH = 4 à 5 (virage du papier au rouge Congo). On laisse la solution se refroidir pendant une nuit. Le précipité est alors recueilli et lavé à l'eau distillée par centrifugation. On le remet en suspension dans 400 cm³ d'eau distillée acidulée par 1 ou 2 cm³ d'acide chlorhydrique. On fait passer un courant d'hydrogène sulfuré. Le précipité de sulfure de cuivre est lavé à l'eau légèrement chlorhydrique. On concentre le filtrat et les eaux de lavage à 150 cm³. On élimine les traces d'acide sulfurique sous forme de sulfate de baryum par addition d'un petit excès de baryte. On filtre et lave ce précipité avec de l'acide chlorhydrique très dilué. Dans la liqueur la cystine est dosée par la détermination soit de l'azote, soit du soufre qu'elle apporte. Il s'agit donc d'une méthode d'échelle macro-analytique, son adaptation à l'échelle micro-analytique a été réalisée par GRAFF (17) qui fixe sa préférence sur le dosage du soufre après son oxydation à l'état de sulfate sous la forme de sulfate de baryum qu'il pèse.

6° CONDENSATION

AVEC LA DIMÉTHYL- P - PHÉNYLÈNE DIAMINE

En 1930, FLÉMING signale que la cystéine conduit à l'obtention d'une coloration bleue quand on la chauffe avec la diméthyl p. phénylène diamine, en présence de perchlorure de fer. En fait, la réaction s'apparente à l'obtention du bleu de méthylène qui prend naissance dans les mêmes conditions avec l'hydrogène sulfuré.

TOYODA (48) présente en 1934 la première technique découlant de ce principe. Puis VASSEL (59) décrit la technique suivante qui présente l'avantage de doser la cystéine et la cystine.

L'hydrolyse porte sur 25 à 100 mg. de protéine que l'on chauffe à reflux pendant 18 heures en présence de 2 cm³ du mélange constitué de 58 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et de 63 cm³ d'acide formique à 90 p. 100. En fin d'opération l'hydrolysate est dilué à 10 cm³ par addition d'acide chlorhydrique 5 N.

1° *Dosage de la cystéine* : dans un tube à essai introduire 165 mg. de poudre de zinc, 3 cm³ de réactif à la diméthyl-p-phénylène diamine (*) et 2 cm³ d'une solution d'alun de fer à 20 p. 100 cm³ d'acide sulfurique N. Attendre 10 minutes à la température du laboratoire avant de porter le tube à essai au bain-marie bouillant jusqu'à dissolution du zinc. Refroidir puis ajouter 1 cm³ de l'hydrolysate protéique (soit 0,05 à 0,2 mg de cystéine) et 3 cm³ de la solution d'alun de fer. Agiter et remettre le tube au bain-marie bouillant pour 45 minutes. Refroidir diluer à 25 cm³. Procéder à la mesure colorimétrique et comparer avec des essais étalons préparés d'une façon identique avec de la cystéine pure (filtre — 580 mμ).

2° *Dosage de la cystine* : prélever 1 cm³ de l'hydrolysate dans un tube à essai, ajouter 3 cm³ du réactif à la diméthyl-p-phénylène diamine et 165 mg. de poudre de zinc. Laisser reposer pendant 2 heures puis ajouter 2 cm³ de la solution d'alun de fer. Agiter et attendre 45 minutes. Ajouter à nouveau 3 cm³ d'alun de fer et maintenir le tube bouché au bain-marie bouillant pendant 45 minutes afin d'assurer la dissolution complète du zinc. Refroidir, diluer à 25 cm³ et procéder à la mesure colorimétrique dans les mêmes conditions que précédemment.

Il est à remarquer que l'intensité de la coloration dépend très étroitement de la concentration en acide du milieu ; il est donc indispensable de la contrôler très soigneusement.

(*) Chlorhydrate de diméthyl-p-phénylène diamine pur 0,5 gr. ; acide sulfurique concentré 50 cm³, eau distillée 100 cm³, puis compléter à un litre.

7° RÉACTION COLORÉE AVEC LE NITROPRUSSIATE

Alors que DENIGES utilise dès 1889 le nitroprussiate de sodium en milieu alcalin pour déceler les mercaptans, MORNER en 1901 paraît être le premier à suggérer l'emploi de ce réactif pour le dosage de la cystéine.

Après SHINOHARA et KILPATRICK (36-37-38-39), KRISHNASWAMY (22) préconise la technique suivante : ajouter 1 cm³ d'acide chlorhydrique concentré à une solution contenant 0,8 à 1,5 mg. de cystine ; diluer à 5 cm³ et ajouter en agitant 2 cm³ d'une solution de cyanure de sodium à 5 p. 100 et 1 cm d'une solution d'hyposulfite à 20 p. 100. Attendre une minute pour ajouter 10 cm³ d'ammoniaque 0,5 N. Après cinq minutes ajouter 0,2 à 0,3 cm³ d'une solution 0,3 M de sulfate de zinc et 1 cm³ d'une solution fraîchement préparée de nitroprussiate de sodium à 5 p. 100. Mélanger et faire immédiatement la lecture colorimétrique. La coloration est stable seulement pendant 6 à 7 minutes à la température ordinaire.

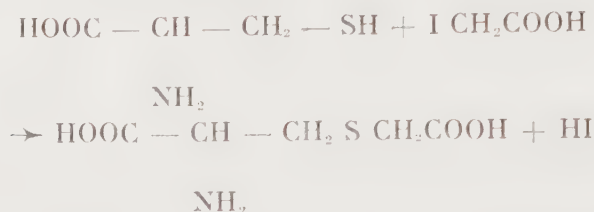
8° MÉTHODES DIVERSES

D'après VAN SLYKE et HAWKINS (49) et BAERSTEIN (5-6), on peut doser la cystéine en la faisant réagir avec l'iode. L'excès de ce dernier est alors évalué volumétriquement d'après le volume d'azote libéré par action de l'iode sur l'hydrazine. Ce procédé a été critiqué par HESS qui le rejette comme donnant d'importantes erreurs par excès (20).

La polarographie a été mise en œuvre par BRDICKA (13), puis par STERN, BEACH et MACY (40-41).

GUTHRIE et ALLERTON (18) utilisent l'action réductrice des groupements -SH sur le soufre. Le dosage se termine par un simple titrage de l'hydrogène sulfuré formé mais la méthode implique la préparation extemporanée de soufre colloïdal, ce qui en complique singulièrement l'application. Néanmoins cette méthode paraît présenter un réel intérêt en ce sens qu'elle peut être pratiquée sans hydrolyse de la protéine.

ROSNER (31) propose de mettre à profit l'action de l'acide mono-iodacétique sur la cystéine d'après :



L'acide iodhydrique résultant de cette réaction est ensuite dosé d'après l'icde libéré au contact de l'eau oxygénée :



Dans le même ordre d'idée HELLERMANN (19) substitue l'acide o-iodobenzoïque à l'acide mono-iodacétique.

La méthode de NAKAMARA (29) est basée sur la coloration obtenue par action de la brucine en milieu faiblement acide et en présence d'un oxydant (per-sulfate) sur la cystéine.

Enfin, des tests microbiologiques peuvent être utilisés pour caractériser et même doser la cystine et la cystéine. SAUBERLICH et BAUMANN (33-34-35) utilisent dans ce but *Leucorostoc mesenteroides*. BARTON-WRIGHT (7-9) précisent la composition du milieu de culture. Sur cette question qui sort du domaine de l'analyse strictement chimique on consultera également les mémoires de LEMAN et ses élèves (26-27-28), de BARTON et WRIGHT (7-8-9), de TOENNIES et élèves (44-45-46) et d'ALABANÈSE (1-2-3-4).

Le tableau I présente les teneurs en cystéine de quelques protéines déterminées par différents auteurs utilisant des méthodes diverses.

TABLEAU I

Teneurs en cystéine de quelques protéines (calculé pour 16 g. p. 100 d'azote) selon divers auteurs et diverses méthodes de dosages.

PROTEINES	CYSTEINE (Valeurs extrêmes) (gr. p. 100)
Hémoglobine (cheval)	0,4 à 0,7
Globine (homme)	0,58 à 0,68
Globine (cheval)	0,39 à 0,49
Sérum albumine (homme)	5,0 à 6,0
Sérum albumine (cheval)	5,7 à 6,3
Sérum globuline (cheval)	1,9 à 3,4
Sérum globuline (homme)	2,4 à 3,5
Albumine d'œuf	0,9 à 2,9
Insuline	11,8 à 13,6
Cheveux	13,4 à 19,6
Kératine (laine)	7,0 à 15,3
Edestine	0,5 à 1,5
Gliadine	1,6 à 2,5
Zéine	0,5 à 1,1
Mosaïque du tabac	0,5 à 0,7

OBJET DU TRAVAIL

De notre brève introduction, il ressort que les méthodes de dosage de la cystéine ou de la cystine sont nombreuses, mais aussi qu'elles ne donnent pas entière satisfaction, comme on peut en juger en considérant les résultats obtenus à la suite du dosage de cet acide aminé dans une même protéine mais en utilisant des méthodes différentes. Le tableau 1 (Voir page 19) montre que de tels résultats varient parfois du simple au double.

Nous n'insisterons pas davantage devant de telles imperfections si ce n'est pour souligner l'intérêt qui s'attache à toute recherche entreprise dans le but de perfectionner les méthodes de dosage de la cystine. Tel a été notre but principal, il convient cependant de définir les limites du cadre de notre travail.

Nous avons repris le principe des méthodes de dosage fondées sur l'alcalino-labilité du soufre de la cystine. Le chauffage en milieu alcalin permet de faire passer le soufre de l'acide aminé sous forme de sulfure. La présence d'hydrate de cadmium conduit alors à la formation de sulfure de cadmium qui présente le grand avantage d'être inoxydable à l'air, même à chaud. Nous nous sommes ensuite proposés de doser l'ion sulfure par iodométrie.

Cette technique a d'abord été étudiée en solution pure. Un problème plus complexe a consisté à l'appliquer aux dosages du soufre dans les protéines. Dans ce but nous avons été tout d'abord amenés à choisir le mode d'hydrolyse de la protéine. Puis il est apparu que le dosage était impraticable dans l'hydrolysât. Nous avons donc cherché à effectuer une séparation préalable de la cystéine dans l'hydrolysât. Nous y sommes parvenus en traitant ce dernier par un excès d'hydrate de cadmium.

Nous avons, en effet, montré que la cystéine est alors quantitativement fixée sur cet hydrate alors que la plupart des autres amino-acides, et en particulier la méthionine, restent en solution.

Cependant une difficulté s'est manifestée du fait que la présence d'une trop grande quantité d'hydrate de cadmium ne permet plus une formation régulière de sulfure lors de la destruction de la cystéine en milieu alcalin. Nous avons tourné cette difficulté en éliminant l'excès

d'hydrate de cadmium par l'acide oxalique qui donne de l'oxalate de cadmium insoluble dans l'eau, tandis que la cystéine repasse en solution. Dans cette dernière la cystéine peut être enfin dosée par la technique que nous avons mise au point en solution pure.

Ce bref résumé trace le plan de l'exposé de nos recherches, à savoir :

- 1° Dosage de la cystéine en solution pure ;
- 2° Dosage de la cystéine dans les protéines :
 - a) hydrolyse des protéines,
 - b) Séparation de la cystéine,
 - c) Dosage final ;
- 3° Applications de notre technique à quelques protéines.

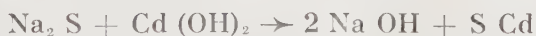
RECHERCHES PERSONNELLES

DOSAGE DE LA CYSTÉINE EN SOLUTION PURE

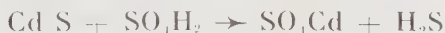
Comme nous l'avons vu le principe de notre méthode est fondé sur la destruction de la cystéine en milieu alcalin et à chaud, réaction à la suite de laquelle le soufre passe à l'état de sulfure ; on peut écrire en supposant que la chaîne carbonée soit respectée :



Le sulfure de sodium est trop facilement oxydable à l'air pour espérer effectuer son dosage avant son altération. Il est donc nécessaire de le convertir immédiatement en un sulfure inoxydable. Nous avons choisi le sulfure de cadmium.



Ce dernier est assez facilement soluble en milieu acide en libérant l'hydrogène sulfuré.



Si l'on opère en présence d'un excès d'iode, l'hydrogène sulfuré est immédiatement oxydé d'après :



Il ne reste plus qu'à doser l'excès d'iode. On réalise ainsi un dosage précis des sulfures.

Nos recherches vont dès lors consister à établir les conditions dans lesquelles il convient d'opérer pour obtenir la formation quantitative d'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine mise en œuvre. Nos essais d'orientation dont nous nous dispensons de présenter un exposé fastidieux nous ont permis de nous arrêter à la technique ci-dessous.

Des quantités connues de cystéine sont dissoutes dans l'eau à la faveur d'une trace d'acide chlorhydrique. On prélève des prises d'essais de ces solutions apportant de 0,300 à 0,500 mg. de cystéine, que l'on introduit dans un matras à micro kjeldahl dont on a conservé que 5 cm. environ du col. On ajoute 0,2 cm³ du réactif cadmique de formule :

Sulfate de cadmium cristallisé	13 gr.
Solution N d'acide sulfurique	60,5 cm ³
Eau distillé q.s.p.	1.000 cm ³

On ajoute enfin 1 cm³ de lessive de soude à 40 p. 100. On introduit une petite bille de verre et, en chauffant avec précaution et en agitant, on évapore la presque totalité de l'eau. Cette opération est assez délicate et exige un certain entraînement. On obtient ainsi un résidu sirupeux qui est déjà nettement teinté de jaune pâle. On place alors sur le matras un petit réfrigérant à reflux d'Hopkins et on chauffe le matras en le maintenant pendant 20 minutes sur un bain de sable à 200 C. Laisser refroidir et diluer par addition de 1 à 2 cm³ d'eau distillée. Porter à l'ébullition pour bien décoller le sulfate de cadmium formé. Transvaser dans un flacon à large ouverture pouvant boucher à l'émeri, ainsi que les eaux de trois lavages du matras (2 cm³ d'eau distillée pour chaque lavage). Après refroidissement complet, ajouter 5 cm³ d'une solution 2,5 N d'acide sulfurique et, immédiatement après 2 cm³, très exactement mesurés d'une solution 0,01 N d'iode. Laisser réagir pendant 20 minutes à l'obscurité.

Au bout de ce temps, procéder au dosage de l'excès d'iode. Pour cela il convient d'opérer en milieu neutre ou très légèrement acide ; on ajoutera donc 15 cm³ d'une solution saturée de borate de sodium. Titrer alors l'excès d'iode au moyen d'une solution 0,01 N d'hyposulfite (préparée extemporanément par dilution de la solution 0,1 N) contenue dans une microburette graduée au 0,01 de centimètre cube. L'indicateur de virage est une solution d'amidon soluble préparée selon LEULLIER.

Pour le calcul des résultats on tiendra compte que 1 cm³ de la solution d'hyposulfite correspond à 0,160 mg. de soufre soit à 0,605 mg. de cystéine.

Naturellement il est indispensable de procéder au tirage d'un essai témoin, conduit d'une façon identique depuis l'étape de la minéralisation alcaline au cours de laquelle la solution de cystéine aura été remplacée par un égal volume d'eau distillée.

Le tableau ci-dessous contient les résultats des dosages que nous avons effectués avec la technique décrite ci-dessus dans des solutions dont

nous connaissons la teneur exacte en cystéine. (Nos pesées de cystéine ont été contrôlées par un dosage d'azote dans les solutions utilisées.)

TABLEAU II

Dosages de la cystéine en solutions pures selon notre technique

Cystéine mise en œuvre (a) (en mgr.)	Cystéine dosée (b) (en mgr.)	Ecart (a — b)	Erreur relative (en p. 100)
0,290	0,302	+ 12	+ 4
0,290	0,291	+ 1	0
0,290	0,296	+ 6	+ 2
0,298	0,291	— 7	— 2,3
0,298	0,287	— 11	— 3,7
0,382	0,378	— 4	— 1
0,382	0,378	— 4	— 1
0,382	0,382	0	0
0,397	0,406	+ 9	+ 2,3
0,397	0,406	+ 9	+ 2,3
0,397	0,412	+ 15	+ 3,8
0,484	0,476	— 8	— 1,6
0,497	0,492	— 5	— 1
0,497	0,495	— 2	— 0,4
0,581	0,567	— 14	+ 2,3
0,581	0,574	— 7	— 1,0

Erreur relative moyenne — 1,8 p. 100

De l'examen du tableau II il ressort que notre technique nous a donné des résultats satisfaisants. Elle nous a permis de doser de 0,300 à 0,600 mg. de cystine avec une précision de l'ordre de 2 p. 100. Les erreurs extrêmes ne sont jamais prohibitives puisqu'elles ont pour valeur — 3,7 et + 3,8 p. 100 et sont exceptionnelles. Quoique l'erreur moyenne ait pour valeur — 1,8 p. 100 nous n'avons pas cru devoir appliquer de coefficient de correction car les erreurs ne nous ont pas paru être systématiquement des erreurs par défaut.

DOSAGE DE LA CYSTÉINE DANS LES PROTÉINES

HYDROLYSE DES PROTÉINES

De nombreux essais nous ont permis de nous convaincre que la méthode la plus correcte et la plus commode pour l'hydrolyse des protéines en vue du dosage de la cystine est celle préconisée par BOLLING et BLOCK et mettant en œuvre l'acide chlorhydrique et l'acide formique (12).

Le mode opératoire que nous avons adopté est le suivant : la prise d'essai de protéine comprise entre 50 et 250 mg. selon le cas est introduite dans un petit ballon. On y ajoute 2 à 5 cm³ d'une solution 5 N d'acide chlorhydrique et un égal volume d'acide formique à 90 p. 100. On chauffe à l'ébullition sous réfrigérant à reflux pendant 18 heures.

Au bout de ce temps on évapore à sec sous pression réduite. On reprend par l'eau et évapore à nouveau sous vide. Cette opération est effectuée encore à deux reprises de façon à chasser au maximum les acides chlorhydrique et formique. Porter alors l'hydrolysât à volume connu en profitant de cette opération pour le neutraliser aussi exactement que possible. A cette occasion il faut se souvenir qu'un passage en milieu trop nettement alcalin fait courir le risque de la destruction d'une quantité plus ou moins importante de cystéine. Il est donc préférable de maintenir le milieu légèrement acide (soit $\text{pH} = 6$ environ).

SÉPARATION DE LA CYSTEINE

Nous avons tout d'abord essayé de doser la cystéine dans une fraction de l'hydrolysât protéique obtenu comme il vient d'être décrit dans les pages précédentes. Disons immédiatement que cette tentative a abouti à un échec. En effet, au cours du chauffage en milieu sodique il s'est produit un abondant charbonnement ayant pour résultat de fournir une solution noirâtre et trouble lors de la reprise par l'eau. Enfin, la présence d'une importante quantité de substances réductrices indéterminées dans cette liqueur rend le dosage iodométrique impossible.

Devant ces difficultés nous avons compris qu'une séparation de la cystéine présente dans l'hydrolysate permettrait seule d'appliquer notre technique au dosage dans les protéines.

Nous sommes parvenus à un résultat satisfaisant en traitant l'hydrolysate protéique par l'hydrate de cadmium. Dans les conditions que nous allons préciser, la cystéine est totalement fixée sur l'hydroxyde de cadmium tandis que la plupart des autres acides aminés, la méthionine comprise, restent en solution. Auparavant nous croyons utile de rendre compte des essais qui nous ont permis de nous convaincre que ce procédé de séparation est quantitatif et, dans une certaine mesure, spécifique. Nous avons préparé des solutions contenant des quantités connues de cystéine ou de méthionine ou encore un mélange de ces deux acides aminés. A 1 cm³ de ces solutions on ajoute 8 cm³ de réactif cadmique (voir formule, page 33), puis, peu à peu et en agitant, 1 cm³ d'une solution 1,1 N de soude. On filtre, on centrifuge, lave le précipité à l'eau en joignant les eaux de lavage au premier filtrat. Dans ce dernier on dose l'azote par la micro-méthode de Kjeldahl. Ce dosage permet de constater que l'azote présent dans le filtrat représente exactement l'azote apporté par la méthionine dans les cas où l'essai a porté sur des solutions de méthionine ou sur des solutions de méthionine et de cystéine. Lorsqu'il s'agit de solution de cystéine le filtrat ne contient pas d'azote. Le tableau ci-dessous contient les résultats de ces essais.

TABLEAU III

Etude de la précipitation de la cystéine par l'hydrate de cadmium

Solution mise en œuvre (mg. d'acide aminé par cm ³)		Azote dosé dans le filtrat cadmique (A) mg.	Méthionine calculée d'après (A)
I. Cystéine	0,360	0	—
»	0,540	0	—
»	12,50	0	—
II. Méthionine	14,00	0,875	13,9
»	21,00	1,34	21,3
III. Méthionine	14,00	0,88	14,0
+ cystéine	0,540		
IV. Méthionine	7,0	0,43	6,85
+ cystéine	12,5		

De l'examen du tableau III il ressort que la cystéine est quantitativement précipitée par l'hydrate de cadmium en milieu neutre. Par contre, la méthionine ne l'est pas et passe intégralement dans le filtrat. Le procédé étudié permet donc la séparation de ces deux acides aminés sulfurés.

Ce fait établi, il nous reste à envisager le dosage de la cystéine retenue sur le précipité d'hydrate de cadmium. Pour cela nous avons tout d'abord songé à traiter le précipité cadmique par de la lessive de soude à chaud, dans le but d'obtenir la formation de sulfure de cadmium. Ce faisant nous nous sommes rapidement rendu compte que nous opérons en présence d'un trop grand excès d'hydroxyde de cadmium et la manipulation est irréalisable. Aussi avons-nous pensé à éliminer le cadmium sous forme d'un dérivé insoluble tout en faisant repasser la cystéine en solution. Pour cela nous avons agité le précipité d'hydrate de cadmium avec un léger excès d'une solution d'acide oxalique. Il se forme alors de l'oxalate de cadmium, particulièrement insoluble dans l'eau même en milieu légèrement acide et la cystéine, libérée de sa combinaison cadmique repasse en solution. Dans cette dernière le dosage pourra être poursuivi selon la technique ordinaire.

Voici le mode opératoire que nous avons suivi pour vérifier que ce procédé permet bien de récupérer la totalité de la cystéine apportée par une solution de teneur connue en cet amino-acide.

Un centimètre cube d'une solution apportant 0,500 mgr. de cystéine est introduit dans un tube à centrifuger. On ajoute 8 cm³ de réactif cadmique (voir formule page 24) et tout en agitant 1 cm³ d'une solution 1,1 N de soude. On centrifuge et lave trois fois le précipité à l'eau distillée. Le culot de centrifugation est repris par 1,4 cm³ d'une solution N d'acide oxalique. On agite vivement avec une petite baguette de verre. On attend 5 minutes et on centrifuge. La liqueur surnageante est transvasée dans le matras à Kjeldahl. Le précipité d'oxalate de cadmium est lavé par centrifugation en utilisant à deux reprises, 2 cm³ d'une solution diluée (0,025 N) d'acide oxalique et on joint les liquides de lavages au premier liquide de centrifugation. On ajoute alors 0,2 cm³ de réactif cadmique puis 1 cm³ de soude à 40 p. 100 et on procède par chauffage à la destruction de la cystéine. Le sulfure de cadmium formé est titré iodométriquement comme il est indiqué page 24. Le tableau IV contient les résultats de ces essais effectués en solution pure.

TABLEAU IV

Récupération de la cystéine fixée sur l'hydrate de cadmium
à la suite de l'action de l'acide oxalique

a. — Cystéine mise en œuvre (mg. dans la prise d'essai)	b. — Cystéine retrouvée (mg.)	Ecart (a - b)	Erreur relative (p. 100)
253	255	+ 2	+ 0,6
253	248	— 5	— 2
354	345	— 9	— 2,6
189	187	— 2	1
189	187	— 2	1
252	260	+ 8	3,2
252	266	+ 14	5,6
378	378	0	0
630	629	— 1	0
630	625	— 5	0,8
496	508	+ 9	1,8
433	442	+ 9	2
260	254	— 6	2,3
346	344	— 2	0,6
450	448	— 2	0,4
540	538	— 2	0,3
630	623	— 7	0,1
720	730	+ 10	0,1
Erreur relative moyenne			+ / — 1,5

De l'examen du tableau IV il ressort que le traitement par l'acide oxalique permet de libérer intégralement la cystéine fixée sur un excès d'hydroxyde de cadmium. La précision du dosage demeure la même que lorsqu'on opère directement sur une solution de cystéine.

L'erreur relative moyenne est ici (tableau IV) de — 1,5 p. 100 et par conséquent du même ordre de grandeur (— 1,8 p. 100) que celle concernant les résultats des dosages effectués en solution pure (voir tableau II, page 26).

APPLICATION DE NOTRE TECHNIQUE A QUELQUES PROTÉINES

Les recherches dont nous venons d'exposer les résultats nous ont conduits à la mise au point d'une technique de dosage de la cystéine et de la cystine dans les protéines. On trouvera, ci-après les résultats des dosages que nous avons pratiqués dans diverses protéines à savoir : gélatine (additionnée de quantités connues de cystéine), globine de cheval, édestine, cheveux, protéines sériques, thymo-histone pure, et dans le glutathion. Auparavant, nous croyons utile de décrire en détails le mode opératoire résultant de nos recherches.

MODE OPERATOIRE

1° Hydrolyse :

On pèse avec précision, selon la teneur présumée, 50 à 250 mg. de protéines que l'on introduit dans un ballon de 50 cm³ environ. On ajoute 2 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N et 2 cm³ d'acide formique par fraction de 50 mg. de protéine mis en œuvre. On munit le ballon d'un réfrigérant à reflux et on poursuit l'hydrolyse pendant 18 heures en maintenant une douce ébullition.

Le contenu du ballon est alors évaporé à sec sous pression réduite. On reprend le résidu par quelques centimètres cubes d'eau distillée et on évapore à nouveau à sec sous le vide. Cette opération est renouvelée encore une fois ; elle permet de chasser au maximum les acides chlorhydrique et formique. L'hydrolysate est prêt pour la séparation de la cystéine.

2° Séparation de la cystéine et de la cystine :

Le résidu contenu dans le ballon est repris par 8 cm³ de réactif cadmique (*). Filtrer en recevant le filtrat dans un tube à centrifuger, laver le ballon et le filtre à deux reprises en utilisant un minimum d'eau distillée ; les liquides de lavages sont joints au premier filtrat. Ajouter à celui-ci peu à peu et en agitant de la soude N jusqu'à ce que l'on observe un léger précipité d'hydrate de cadmium *persistant*. A partir de cet instant ajouter 1 cm³ de soude N exactement mesuré. Agiter. Centrifuger et laver le précipité à deux reprises, sans craindre d'utiliser un excès d'eau distillée (**). Reprendre le culot de centrifugation par 1,4 cm³ d'une solution N d'acide oxalique. Agiter vivement et attendre au moins cinq minutes pour être certain de la transformation de l'hydrate en oxalate de cadmium. Centrifuger ; recueillir le liquide surnageant dans un ballon jaugé de 10 à 50 cm³ selon la richesse en cystéine. Laver le précipité à deux reprises au moyen d'une solution diluée (0,015 N) d'acide oxalique en recueillant les liquides de lavages. Porter à volume connu.

3° Dosage de la somme cystine + cystéine :

De la solution précédemment obtenue prélever une fraction aliquote convenable correspondant à 0,3 à 0,6 mg. d'acide-amino et l'introduire dans un matras à microkjeldahl à col raccourci, ajouter 0,2 de réactif cadmique et 1 cm³ de soude à 40 p. 100. Chasser à feu nu et en agitant la plus grande partie de l'eau. Le liquide visqueux, teinté en jaune ainsi obtenu est chauffé pendant 20 minutes au bain de sable à 200°C, sous réfrigérant d'Hopkins. Après refroidissement le sulfure de cadmium est entraîné au moyen d'eau distillée dans un flacon de 90 cm³ bouchant à l'émeri. Ajouter 5 cm³ d'une solution N d'acide sulfurique puis 2 cm³ très exactement mesurés d'une solution 0,01 N d'iode. Boucher et laisser réagir à l'obscurité pendant 20 minutes. Au bout de ce temps ajouter 15 cm³ d'une solution saturée de borate de sodium et procéder au titrage de l'excès d'iode au moyen d'une solution 0,01 d'hyposulfite de sodium contenue dans une microburette en présence d'empois d'amidon ; soit n cm³ de solution d'hyposulfite 0,01 N versé à la suite de ce titrage.

L'essai témoin est réalisé en remplaçant l'hydrolysate protéique par un égal volume d'eau auquel on fera subir les opérations de la minéralisation alcaline et les diverses opérations relatives au dosage iodométrique des sulfures ; soit N cm³, le volume de solution 0,01 N d'hyposulfite versé au cours de ce titrage.

(*) Réactif cadmique -- sulfate de cadmium crist : 13 gr. solution N d'acide sulfurique : 60,5 cm³ ; eau distillée : q.s.p. 1000).

(**) Le liquide surnageant doit être rigoureusement neutre. S'il présentait une réaction nettement alcaline le dosage conduirait à des résultats par défaut.

Calcul des résultats

La quantité de cystéine contenue dans la prise d'essai répondant à la fraction aliquote de la liqueur oxalique est donnée par :

$$(N - n) \times 0,605 = \text{mgr de cystéine}$$

Voici maintenant les résultats de l'application de notre technique au dosage de la somme cystine + cystéine dans diverses substances protéiques.

Env'sageons tout d'abord les essais spéciaux qui ont consisté à doser de la cystéine ajoutée en quantité connue à de la gélatine, protéine dépourvue de cet amino-acide. Ces expériences ont eu pour but de vérifier que l'hydrolyse n'entraîne pas de perte en cystéine. Nous les avons réalisés en ajoutant des quantités variables de cystéine à 100 mgr. de gélatine et soumettant le mélange à l'hydrolyse chlorhydro-formique. Le tableau V contient les résultats de ces essais.

TABLEAU V

**Dosage de la cystéine ajoutée à de la gélatine
et comportant l'hydrolyse du mélange**

Gélatine + cystéine ajoutée		Cystéine retrouvée	Erreur p. 100
100	0	0	—
100	2,75	2,65	— 3,6
100	2,75	2,65	— 3,6
100	4,50	4,54	+ 1,0
100	4,50	4,48	— 0,5
100	4,50	4,36	— 3,1
100	4,50	4,42	— 1,7

De l'examen du tableau V il ressort que notre technique permet de retrouver, aux erreurs d'expériences près, la cystéine ajoutée à la gélatine. L'hydrolyse, effectuée selon les conditions que nous avons adoptées n'entraîne donc pas de pertes en cystéine.

Le tableau VI contient les résultats des dosages effectués dans diverses protéines, le glutathion et le sérum sanguin. Dans ce dernier cas nous avons soumis un cm³ de sérum humain à l'hydrolyse. En ce qui concerne les protéines nos résultats sont exprimés en p. 100 de protéine supposée présenter un taux fixe de 16 p. 100 d'azote, conformément à une coutume conventionnelle adoptée par les auteurs américains. Nous avons donc été obligés de doser l'azote dans les échantillons de protéines que nous avons utilisés. Les valeurs trouvées dans la littérature servent de terme de comparaison.

TABLEAU VI

Teneur en cystéine + cystine de quelques substances protidiques
selon notre méthode

PROTEINE ou SUBSTANCE mise en œuvre	CYSTEINE DOSEE p. 100	CYSTEINE p. 100 (d'après divers auteurs)
GLOBINE (cheval)	0,82	0,7 à 0,8
GLOBINE (cheval)	0,83	0,7 à 0,8
GLOBINE (cheval)	0,81	0,7 à 0,8
ÉDESTINE	0,95	0,7 à 1,5
ÉDESTINE	0,95	0,7 à 1,5
CHEVEUX	17,90	13,4 à 19,6
CHEVEUX	17,80	13,4 à 19,6
SÉRUM SANGUIN (homme) (azote pro- téique = 11,1 gr par litre)	332 mg. p. 1.000 cc. 340 mg p. 1.000 cc.	(en bon accord avec la teneur des protéines sériques)
HISTONE PURE	0,35 — 0,34	(pour une teneur arbi- traire de 16 p. 100 d'azote)
GLUTATHION	38,8 p. 100 38,6 p. 100 38,3 p. 100	39,4 p. 100 39,4 p. 100 39,4 p. 100

Les résultats contenus dans le tableau VI montrent que les valeurs que nous avons déterminées par notre technique s'accordent d'une façon très satisfaisante avec celles obtenues par différents auteurs. La détermination dans une histone pure préparée par GRÉGOIRE à partir du thymus de veau est une donnée nouvelle (0,35 p. 100). Les résultats obtenus à partir du glutathion représentent un contrôle satisfaisant de notre technique. Enfin, il y a lieu de signaler la concordance, à moins de 2 p. 100 près des différents essais pratiqués sur la même substance, ce qui démontre la fidélité de notre méthode.

CONCLUSION

Nos conclusions seront très brèves.

Notre travail nous a permis de mettre au point une technique de dosage de la somme cystéine + cystine dans les protéines, fondée sur la labilité de la liaison du soufre à la chaîne carbonée de ces amino-acides. Celui-ci est détaché sous l'action des alcalis et fixé sous forme de sulfure de cadmium. Le dosage iodométrique de l'ion sulphydrique termine le dosage. Comme nous l'avons vu dans notre introduction ce principe a déjà été mis en œuvre dans la méthode de THOMAS et HENDRICKS. Celle-ci ne paraît pas avoir trouvé la faveur des analystes ; sans doute le déplacement par aération de l'hydrogène sulfuré qu'elle comporte, a-t-il été considéré comme une complication opératoire faisant courir le risque d'une perte de sulfure ? Nous avons évité cet inconvénient en procédant au dosage direct du sulfure de cadmium par iodométrie, ce qui n'a soulevé aucune difficulté dans le cas des dosages de la cystéine en solution pure.

Par contre, les difficultés rencontrées dans le cas du dosage dans les hydrolysats protéiques nous a contraints à envisager une séparation préalable de la cystéine.

Nous avons décrit le procédé original qui nous a permis d'atteindre ce but. Il consiste à fixer la cystéine sur l'hydrate de cadmium en milieu neutre. L'excès de cadmium introduit rend alors la suite des manipulations pratiquement impossible. Ici encore un procédé original nous a permis d'éliminer l'excès de cadmium sous forme d'oxalate de cadmium. La manipulation est très simple et permet l'obtention d'une solution dépourvue de substances susceptibles d'entraver la formation de sulfure de cadmium et le dosage iodométrique.

En cela, nos recherches nous ont permis d'apporter d'utiles perfectionnements techniques à une méthode fondée sur un principe déjà connu. Ces perfectionnements se traduisent par les avantages suivantes :

1° Notre méthode permet le dosage de 0,250 à 0,600 mg. de cystéine, soit en solution pure, soit dans les hydrolysats protéiques.

2° Les conditions d'hydrolyse que nous préconisons à la suite des travaux de SULLIVAN, HESS et SMITH ne provoquent aucune perte en acide aminé ; sous l'action réductrice de l'acide formique toute la cystine est transformée en cystéine, si bien que le dosage final est l'expression de la somme cystine + cystéine.

3° La précision de notre technique est de $\pm 2 \text{ p. } 100$ (voir tableau VI).

4° La fidélité est très satisfaisante ainsi qu'il ressort de l'accord existant entre plusieurs dosages effectués sur la même substance (voir tableau VI).

5° Aucun des temps de la technique n'introduit de sérieuses difficultés opératoires et les dosages en série sont possibles.

L'application de notre technique à diverses protéines nous a permis d'apprécier sa valeur en comparant nos résultats avec ceux des auteurs ayant antérieurement dosé la cystéine dans les mêmes protéines par diverses méthodes. Les valeurs que nous avons relevées dans la littérature montrent des divergences parfois surprenantes par leur importance (voir tableau I) et qui témoignent des imperfections de certaines des méthodes antérieurement proposées. Nos résultats s'intercalent avec un accord satisfaisant dans les limites des données classiques (voir tableau VI). Signalons que la teneur en cystéine de la thymo-histone (soit 0,35 p. 100) est une donnée nouvelle.

EN RÉSUMÉ, nous pensons que la technique que nous proposons mérite de prendre rang à côté des meilleurs en ce sens, que, ne comportant que des manipulations simples elle se recommande d'une précision satisfaisante ($\pm 2 \text{ p. } 100$) alliée à une fidélité et une spécificité qui ressortent du travail de biochimie analytique qui a fait l'objet de notre thèse.

Vu, le président du Jury,
Professeur C. DUMAZERT.

Vu et approuvé,
pour le Doyen, l'Assesseur,
Professeur J. DELPHAUT.

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur BLACHE.

BIBLIOGRAPHIE

1. - ALBANESE A.-A., FRANKSTON J.-E., IRBY V. — The estimation of methionine in protein hydrolysates and human urine., *J. Biol. Chem.*, (C), 156, 293-302, 1944.
2. - ALBANESE A.-A., IRBY V. — The colorimetric determination of isoleucine in biological products. — *Arch. Biochem.*, 17, 21-30, 1948.
3. - ALBANESE A.-A., DAVIS V.-I., LEIN M., SMETAK E.-M. — The biochemistry of the metabolic fecal protein nitrogen. — *J. Biol. Chem.*, 176, 1189-1198, 1948.
4. - ALBANESE A.-A., DAVIS V.-I., SMETAK E.-M., LEIN M., FISHER M. — Amino acid analyses of the nondiffusible fraction of enzymatic protein digests and human urine. — *Arch. Biochem.*, 20, 47-54, 1949.
5. - BAERNSTEIN H.-D. — The gasometric determination of cysteine and cystine. — *J. Biol. Chem.*, 89, 125-131, 1930.
6. - BAERNSTEIN H.-D. — The sulfur distribution in proteins. — *J. Biol. Chem.* (B), 97, 669-674, 1932.
7. - BARTON-WRIGHT E.-C. — The microbiological assay of amino acids. I. The assay of tryptophan, leucine, isoleucine, valine, cystine, methionine, lysine, phenylalanine, histidine, arginine, and threonine. — *The Analyst* (A), 71, 267-278, 1946. — *Chem. Abs.*, 40, 5471, 1946.
8. - BARTON-WRIGHT E.-C. — The microbiological assay of amino acids. II. — The distribution of amino acid in the wheat grain. — *The Analyst* (B), 74, 278-282, 1946. — *Chem. Abs.*, 40, 5471, 1946.
9. - BARTON-WRIGHT E.-C., CURTIS N.-S. — Modified Method for the microbiological assay of tryptophan, methionine, cystine, and tyrosine., *Analyst.*, 73, 330-333, 1948.
10. - BLOCK R.-J., BOLLING D. — *The determination of the amino acids*. Minneapolis, Minn., Burgess, 1940, 58 Pp.
11. - BLUMENTHAL D., CLARKE H.-T. — Unrecognized forms of sulfur in proteins., *J. Biol. Chem.*, 110, 343-349, 1935.
12. - BOLLING M., BLOCK R.-J. — Amino acids yielded by β lactoglobulin. — *Arch. Biochem.*, 2, 93-95, 1943.
13. - BERDICKA R. — Polarographische mikrobestimmung von cystin und cystein in hydrolysaten von einigen proteinen. — *Mikrochemie*, 45, 167-180, 1934.
14. - FOLIN O. — A system of blood analysis. A new colorimetric method for the determination of the amino-acid nitrogen in blood. — *J. Biol. Chem.*, (A), 54, 377-391, 1922.
15. - FOLIN O., LOONEv J.-M. — Colorimetric methods for the separate determination of tyrosine, tryptophan and cystine in proteins. — *J. Biol. Chem.* (B), 54, 421-434, 1922.

16. FOLIN O., MARENZI A.-D. — *In improved colorimetric method for the determination of cystine in proteins.*, *J. Biol. Chem.* (B), (83), 103-108, 1929.
17. - GRAFF S., MATULLA E., GRAFF A.-M. — The composition of the tissus proteins. IV. The estimation of cystine. — *J. Biol. Chem.*, 121, 81-86, 1937.
18. - GUTHRIE J.-D., ALLERTON J. — Use of sulfur as a reagent for the estimation of the sulphydryl groupe off egg albumin. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 12, 103-109, 1941.
19. - HELLERMAN L., CHINARD F.-P., RAMSDELL P.-A. — o-Iodosenbenzoic acid, a reagent for the estimation of cysteine, glutathione and the substituent sulphydryl groups of certain proteins. — *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 2555-2553, 1941.
20. - HESS W.-C. — The gasometric method for the estimation of cysteine and cystine., *J. Biol. Chem.* (A), 109, LIV, 1933.
21. - HESS W.-C., SULLIVAN M.-X., PALMES S.-D. — The colorimetric determination of cystine in tobacco mosaic virus protein. — *Proc. Soc. Exptl. Biol and Med.*, 48, 353-355, 1941.
22. - KRISHNASWAMY T.-K. — Estimation of cystine by nitroprusside. — *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 15 A, 135-138, 1942, from *Chem. Abs.* 35 : 4.058, 1942.
23. - LAVINE T.-F. — The iodometric determination of cysteine. — *J. Biol. Chem.*, 109, 141-145, 1942.
24. - LUGG J.-W.-H. — Some sources of error in the estimation of cysteine and cystine in complex materials when acid hydrolysis is employed. — *Biochem. J.*, (B), 27 : 1022-1029, 1933.
25. - LUGG J.-W.-H. — Preparation of some proteins samples from the fresh leaves of plants and the sulfur distribution of the preparations. *Biochem. J.* (B), 32, 2114-2122, 1938.
26. - LYMAN C.-M., KUIKEN K.-A., NORMAN W.-H., HALE F. — Microbiological determination of amino acids. — *Sciences*, 98 : 256, 1943, *J. Biol. Chem.* 151 : 615-26, 1943.
27. - LYMAN C.-M., KUIKEN K.-A., BLOTTER L., HALE F. — The microbiological determination of amino acids. II. Glutamic acid. — *J. Biol. Chem.*, 157 : 395-405, 1945.
28. - LYMAN C.-M., MOSELEY O., BUTLER B., WOOD S., HALE F. — The microbiological determination of amino acids. III. Méthionine. *J. Biol. Chem.* (B), 165 : 161-171, 1946.
29. - NAKAMURA K., BINKLEY F. — Colorimetric estimation of cysteine. *J. Biol. Chem.*, 173 : 407-410, 1948.
30. - OKUDA Y. — A new method for the determination of cystine in proteins (the iodine method). — *J. Biochem. (Japan)*, 5, 216-227, 1925.
31. - ROSNER L. — The reaction between iodoacetic acid and denatured egg albumin. *J. Biol. Chem.*, 132 : 657-662, 1940.
32. - ROSSOUW S.-D., WILKEN-JORDEN T.-J. — Studies on the origin of sulphur in wool. II. A. cuprous mercaptide method for the determination of cystine and cysteine. — *Biochem. J.*, 29 : 219-224, 1935.

33. - SOUBERLICH H.-E., BAUMANN C.-A. — The effect of dietary protein upon amino acid excretion by rats and mice. — *J. Biol. Chem.*, **166** : 417-428, 1946.
34. — SAUBERLICH H.-E., PEARCE E.-L., BAUMANN C.-A. — Excretion of amino acids by rats and mice fed proteins of different biological values. — *J. Biol. Chem.*, **175** : 29-38, 1948.
35. - SAUBERLICH H.-E., BAUMANN C.-A. — A microbiological determination of alanine. — *J. Biol. Chem.*, **177** : 545-551, 1949.
36. - SHINOHARA K., KILIPATRICK M. — The stability of cystine in acid solution. — *J. Biol. Chem.*, **105** : 241-251, 1934.
37. - SHINOHARA K. — The determination of thiol and disulfite compounds, with special reference to cysteine and cystine. II. A critical study of the reaction between phospho-18-tungstic acid and other substances than thiol compounds. — *J. Biol. Chem. (B)*, **110** : 263-277, 1935.
39. - SHINOHARA K. — The determination of thiol and disulfide compounds, with special reference to cysteine and cystine. V. A critical study of cystine determination by sulfite and phospho-18-tungstic acid reagent. — *J. Biol. Chem. (C)*, **112** : 683-696, 1935.
40. - STERN A., BEACH E.-F., MACY I.-G. — Polarographic micro-determination of cystine in protein hydrolysates. — *J. Biol. Chem.*, **130** : 733-740, 1939.
41. - STERN A., BEACH E.-F. — Microdetermination of homocystine in pure solution with the dropping mercury cathode. — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **43** : 104-108, 1940.
42. - SULLINVAN M.-X., HESS W.-C. — Improvements in methods of hydrolysis of protein : Shortening the time for estimating cystine. *J. Biol. Chem.*, **117** : 423-428, 1937.
43. - THOMAS M.-D., HENDRICKS R.-H. — The hydrolysis of cystine and the fractionation of sulfur in plant tissues. — *J. Biol. Chem. (B)*, **153** : 313-325, 1944.
44. - TOENNIES G. — The sulfur containing amino acid methionine, *Growth*, **1** : 337-370, 1937.
45. - TOENNIES G., CALLAN T.P. — A comparison of oxidative reactions of methionine, cysteine and cystine. Determination of methionine by hydrogen peroxide oxidation. *J. Biol. Chem.*, **129** : 481-490, 1939.
46. - TOENNIES G. — The oxidative conversion of casein into protein free of methionine and tryptophan. — *J. Biol. Chem.*, **145** : 667-670, 1942.
47. - TOMPSETT S.-L. — A note on the determination of cystine in proteins by the method of Folin and Madenzi. — *Biochem J.*, **25** : 2014-2016, 1931.
48. — TOYODA H. — A micro-method for the determination of disulfide and sulphydryl-compounds. I. *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, **9** : 263-268, 1934.
49. - VAN SLYKE D.D., HAWKINS J.-A. — A gasometric method for the determination of reducing sugars, and its application to analysis of blood and urine. — *J. Biol. Chem.*, **79** : 739-767, 1928.

50. - VASSEL B. — A colorimetric micromethod for the estimation of cystine and cysteine. — *J. Biol. Chem.*, **140** : 323-336, 1941.
 51. - VICKERY H.-B., WHITE A. — The use of cystein cuprous mercaptide in the determination of cystine. — *J. Biol. Chem. (B)*, **99** : 701-715, 1932-33.
 52. - VIRTUE R.-W., LEWIS H.-B. — The iodometric determination of cystine in the urine. — *J. Biol. Chem.*, **104** : 415-421, 1934.
-

